

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



## Bescheinigung

#6  
05.31.99

Die Hoechst Marion Roussel Deutschland GmbH in Frankfurt  
am Main/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der  
Bezeichnung

"Biologisch verträgliche niedermolekular Poly-  
ethylenimine"

am 30. September 1997 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wieder-  
gabe der ursprünglichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Sym-  
bole C 12 N, A 61 K und C 08 G der Internationalen Patent-  
klassifikation erhalten.

München, den 23. Juli 1998

Der Präsident des Deutschen Patentamts

Im Auftrag

Ebert

Aktenzeichen: 197 43 135.6

## Biologisch verträgliche niedermolekulare Polyethylenimine

### 1) EINLEITUNG

Ein wesentlicher Therapieerfolg bei der therapeutischen Applikation von DNA *in vivo* hat sich in klinischen Studien am Menschen bislang noch nicht eingestellt. Die Ursachen sind vor allem in der geringen Effizienz des Gentransfers, der begrenzten Expression der genetischen Information [Cotton et al., Meth. Enzymol. 217: 618-644 (1993)] und der mangelnden Biokompatibilität [Choksakulnimit et al., J. Control. Rel. 34: 233-241 (1995)] der verwendeten kationischen Trägermaterialien zu suchen. Obwohl virale Vektoren, wie Retroviren [Miller, Nature 357: 455-460 (1992)] oder Adenoviren [Mulligan, Science 260: 926-932 (1993)] *in vitro* sehr erfolgversprechende Ergebnisse lieferten, war ihre Anwendung *in vivo* insbesondere aufgrund inflammatorischer und immunogener Eigenschaften sowie der Gefahr der Mutagenese und Integration ins zelleigene Genom limitiert [Crystal, Science 270: 404-410 (1995)]. Als mögliche Alternative boten sich nicht-virale Vektoren an, die nicht nur einfacher zu handhaben sind als virale Systeme, sondern auch sicher und effizient DNA in Zellen einschleusen können [Tomlinson und Rolland, J. Contr. Rel. 39: 357-372 (1996)].

Synthetische Vektoren, basierend auf wasserlöslichen, kationischen Polymeren wie Poly-L-Lysin (PLL) [Wu und Wu, Biotherapy 3: 87-95 (1991)], DEAE-Dextran [Gopal, Mol. Cell. Biol. 5: 1183-93 (1985)], Dendrimern [Haensler und Szoka, Bioconjugate Chem. 4: 372-379 (1993)] oder kationischen Methacrylsäure-Derivaten [Wolfert et al., Hum. Gene Ther. 7: 2123-2133 (1996)] haben sich im Laufe der Zeit als Alternative zu der klassischen Form der Transfektion, die „Lipofektion“ mit kationischen Lipiden [Gao und Huang, Gene therapy 2: 710-722 (1995)] und Amphiphilen [Behr, Bioconjugate Chem. 5: 382-389 (1994)] entwickelt. Der entscheidende Vorteil der „Polyfektion“ mit kationischen Polymeren besteht in der

endlosen Vielzahl struktureller Variationsmöglichkeiten, die die physikochemischen und biologischen Eigenschaften der Polymere und ihrer Plasmid-Polymer-Komplexe in gewünschter Weise beeinflussen können. Durch die zusätzliche Kopplung zellspezifischer Liganden, wie Transferrin [Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 87: 3410-3414 (1990)], Asialoglykoprotein [Wu und Wu, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432 (1987)], sowie verschiedenen Antikörpern [Trubetskoy et al., Bioconjugate Chem. 3: 323-327 (1992)] und Carbohydraten [Midoux et al., Nucleic Acid Research 21: 871-878 (1993)] ließ sich die Effizienz dieser Vektoren erheblich steigern.

Polyethylenimin (PEI), ein kationisches Polymer mit dreidimensionaler, verzweigter Struktur, hat in einer Vielzahl verschiedener adhärenter und Suspensions-Zelllinien zu teilweise überdurchschnittlich hohen Transfektionsraten geführt [Boussif et al., Gene Therapy 3: 1074-1080 (1996)]. 3T3 Fibroblasten beispielsweise konnten *in vitro* zu 95% transformiert werden. Der PEI-vermittelte Gentransfer *in vivo* am Gehirn von Mäusen bewirkte eine Langzeit-Expression von Reportergenen und dem Bcl2-Gen in Neuronen und Gliazellen, die in der gleichen Größenordnung liegt wie beim adenoviralen Gentransfer [Abdallah et al., Hum. Gene Ther. 7: 1947-1954 (1996)].

Polyethylenimin verfügt über herausragende Eigenschaften im Vergleich zu anderen literaturbekannten Polykationen wie PLL [Zenke et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 87: 3655-3659 (1990)], Methacrylat-Derivaten [Cherng et al., Pharm. Res. 13: 1038-1042 (1996)] oder DEAE-Dextran [Gopal, Mol. Cell. Biol. 5: 1183-93 (1985)]. Aufgrund seiner quervernetzten Struktur und hohen Ladungsdichte ist es in der Lage, Plasmide in hohem Maße zu kondensieren und komplexieren. In Form solcher Komplexe kann DNA dann in Zellen eingeschleust werden. Die Mechanismen der Aufnahme, der intrazellulären Prozessierung und der lysotropen Aktivität der PEI-Plasmid-Komplexe sind bis heute nicht endgültig geklärt.



Der entscheidende Vorteil des PEI scheint eine pH-abhängige Veränderung seiner Struktur zu sein, die zu einer Destabilisierung endosomal-lysosomaler Komplexe führt und damit die Freisetzung der Komplexe in das Zytoplasma erleichtert. Insbesondere die Aminofunktionen mit unterschiedlichen pKa-Werten des Moleküls sollen für eine ausgeprägte Pufferkapazität des PEI verantwortlich sein („proton sponge“), die bei der Azidifizierung der Endosomen zu einer Protonierung der Polymere unter Quellung und damit zur Ruptur der Vesikelmembranen führt. Der durch die endosomale ATPase vermittelte Einstrom von Protonen bedingt vermutlich gleichzeitig den passiven Influx anionischer Chloride, der in Anwesenheit von PEI zu einer massiven Erhöhung der Gesamtionenkonzentration und damit zur osmotischen Schwellung der Endosomen führt [Behr, *Chimia* 51: 34-36 (1997)]. Lysosomotrope Agentien wie Chloroquin, die z.B. für die Transfektion von PLL essentiell sind, haben daher keinen Einfluß auf die Transfektionsrate der PEIs [Remy und Behr, *J. Lip. Res.* 6: 535-544 (1996)].

Für die Transfektion von DNA in Zellen werden Polyethylenimine in einem Molekulargewichtsbereich zwischen 50 kDa und 800 kDa (Molmasse 50.000 g/mol bzw. 800.000 g/mol) beansprucht (WO9602655A1).

Kommerziell erhältliches PEI weist nach Angabe des Herstellers (z.B. Fluka, Neu Ulm) ein Molekulargewicht von 600 - 1000 kDa auf. Derartige PEI-Präparationen mit hohem Molekulargewicht (HMW-PEI) besitzen bereits ab einer Konzentration von 0,01 mg/ml und nach kurzer Inkubation von 3 h eine deutliche Zytotoxizität. Des weiteren ist die Polyethyleniminstruktur weder enzymatisch noch hydrolytisch zu spalten und demnach biologisch nicht abbaubar. HMW-PEI ist zudem vermutlich weder über Faeces noch über die Niere ausscheidbar.

In Folge dessen ist die in vivo Verabreichung des bislang verwendeten HMW-PEI zum Beispiel im Rahmen der Gentherapie mit erheblichen Risiken belastet.



## II) Kurzbeschreibung der Erfindung

Es wurde eine Methode zur Herstellung von niedrigmolekularem, kationischem Polymerkonjugat auf der Basis von Polyethylenimin (PEI) durch ringöffnende Polymerisation von Aziridin entwickelt.

Die Herstellung des Ethylenimin erfolgte aus Ethanolamin nach der Methode von Wenker (*JACS* 57: 2328 (1935)). Der Siedepunkt lag bei 55,0 - 56,0°C.

In der Patentanmeldung Ger Pat. 665.791 (1938) ist die Synthese von PEI durch Zugabe von Katalysatoren, wie Säuren oder Bortrifluorid zum flüssigen monomeren Ethylenimin beschrieben. Entsprechend der Erfindung wurde in Analogie zu Dick et al., *J. Macromol. Sci. A4*: 1301-1314 (1970) monomeres Ethylenimin in wässriger Lösung unter Zusatz von Salzsäure polymerisiert.

Für die Polymerisation wurde eine 0,1%ige bis 90%ige Ethylenimin (Monomer) Lösung in destilliertem Wasser unter Rühren hergestellt und 0,1% bis 10% konzentrierte Salzsäure (37%) als Katalysator zugefügt. Die Polymerisation erfolgte über 1-30 Tage bei einer Temperatur von 30-70°C.

Die Charakterisierung der Polymere erfolgte mit <sup>13</sup>C-NMR Spektroskopie, Size-exclusion Chromatographie, Lichtstreuung und Viskosimetrie.

Mit dieser Methode kann niedrigmolekulares PEI (LMW-PEI) mit Molekülgrößen zwischen 500 Da und 50.000 Da hergestellt werden. Das Molekulargewicht des niedrigmolekularen PEI (LMW-PEI) liegt damit deutlich unter dem des HMW-PEI und deutlich unterhalb der Nierenschwelle von 50 kDa, so daß eine renale Elimination gewährleistet sein sollte.

Das Verfahren zur Bestimmung des Molekulargewichts mit Hilfe der Lichtstreuungsmethode ist grundsätzlich in B. Vollmert (1962) "Grundriss der Makromolekularen Chemie", Springer Verlag, Berlin Seiten 216-225 beschrieben.

Überraschenderweise stellte sich nun heraus, daß LMW-PEI in Bezug auf Wirksamkeit als Vektor für die Einführung von Nukleinsäurekonstrukten in Zellen und in seiner biologischen Verträglichkeit dem HMW-PEI deutlich überlegen ist. Am besten geeignet erwies sich LMW-PEI mit Molekülgrößen zwischen 1000 Da und 30.000 Da. Das LMW-PEI ist in der Lage, DNA zu binden, zu kondensieren und zu positivieren. LMW-PEI mit einem Molekulargewicht von beispielsweise etwa 2000 Da führte im Komplex mit DNA enthaltend ein Reportergen [in Gegenwart von Serum] zu 100fach höheren Reportergenexpressionen in Säugerzellen, [beispielsweise in Mausfibroblasten (3T3) und humanen endothelialen Zellen (ECV 304)] als das kommerzielle hochmolekulare (HMW) PEI. Gleichzeitig war die Zytotoxizität des LMW-PEI auf Fibroblasten im Vergleich zum HMW-PEI deutlich reduziert.

Gegenstand der Erfindung ist somit Polyethylenimin mit einem Molekulargewicht unter 50.000 Da, bevorzugterweise zwischen 500 Da und 30.000 Da (LMW-PEI), die Methode zur Herstellung dieses LMW-PEI und die Verwendung von LMW-PEI im Komplex mit viralen und nicht viralen Nukleotidsequenzen für die Einführung von Nukleotidsequenzen in eine Zelle, die Verabreichung dieser Zelle an einen Säuger zum Zwecke der Prophylaxe oder Therapie einer Erkrankung und die Verabreichung von LMW-PEI im Komplex mit einer Nukleotidsequenz an einen Säuger zum Zwecke der Prophylaxe oder Therapie einer Erkrankung.

Da das erfindungsgemäße LMW-PEI weniger stark verzweigt ist als HMW-PEI und daher mehr Aminogruppen enthält als HMW-PEI, bietet LMW-PEI in weitaus besserem Maße als HMW-PEI die Möglichkeit der Kopplung an einen zellspezifischen Liganden. Gegenstand der Erfindung ist somit die Kopplung des LMW-PEI an einen zellspezifischen Liganden und die Verwendung des Kopplungsproduktes im Komplex mit einer viralen oder nicht viralen Nukleotidsequenz für die Einführung der Nukleotidsequenz in eine Zelle oder für die Verabreichung des Komplexes an einen Säuger zur Prophylaxe oder Therapie einer Erkrankung. Die Möglichkeiten der Herstellung und Kopplung von zellspezifischen Liganden ist bereits in den Patentanmeldungen EP97101506.0 und DE19649645.4 ausführlich beschrieben worden. Auf diese Patentanmeldungen wird ausdrücklich Bezug genommen.

Komplexe zwischen LMW-PEI, gegebenenfalls gekoppelt mit einem zellspezifischen Liganden und einem viralen oder nicht viralen Nukleinsäurekonstrukt, stellen einen Vektor für die Gentherapie dar. In einer bevorzugten Ausführungsform werden diese Vektoren Patienten äußerlich oder innerlich, lokal, in eine Körperhöhle, in ein Organ, in den Blutkreislauf, in den Atemweg, in den Magen-Darm-Trakt, in den Urogenitaltrakt oder intramuskulär oder subkutan verabreicht.

Durch den erfindungsgemäßen Vektor kann ein Effektorgen zellunspecific oder zellspezifisch in eine Zielzelle eingeschleust werden, wobei es sich bei dem Effektorgen bevorzugt um ein Gen handelt, das für einen pharmakologisch aktiven Wirkstoff oder aber für ein Enzym kodiert, welches eine inaktive Vorstufe eines Wirkstoffes in einen aktiven Wirkstoff spaltet. Das Effektorgen kann so gewählt sein, daß der pharmakologisch aktive Wirkstoff oder das Enzym als Fusionsprotein mit einem Liganden exprimiert wird und dieser Ligand an die Oberfläche von Zellen, z.B. proliferierenden Endothelzellen oder Tumorzellen, bindet.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch Zellen von Hefen oder Säugern, in die mit Hilfe des erfindungsgemäßen LMW-PEI ein Nukleinsäurekonstrukt eingeführt worden ist. In besonders bevorzugter Ausführungsform werden die Nukleinsäurekonstrukte mit Hilfe des erfindungsgemäßen LMW-PEI in Zelllinien eingebracht, die dann nach Transfektion zur Expression des Transgens verwendet werden können. Diese Zellen können somit zur Bereitstellung einer Heilmittels für Patienten verwendet werden. Eine bevorzugte Verwendung des erfindungsgemäßen LMW-PEI im Komplex mit einem Nukleinsäurekonstrukt besteht in der Behandlung einer Erkrankung, wobei die Bereitstellung des Heilmittels die Einführung des Nukleinsäurekonstruktes in eine Zielzelle und dessen virus- oder zellspezifische oder metabolisch spezifische oder unspezifische und zellzyklusspezifische Expression umfaßt.

Gegenstand der Erfindung ist des weiteren die Verabreichung von Säugerzellen, in die mit Hilfe des erfindungsgemäßen LMW-PEI ein Nukleinsäurekonstrukt eingeführt worden ist, zur Herstellung eines Heilmittels zur Behandlung einer Erkrankung. Beispielsweise können Endothelzellen aus dem Blut gewonnen werden, in vitro mit dem erfindungsgemäßen Vektor behandelt werden und dem Patienten beispielsweise intravenös injiziert werden.

Derartige in vitro transizierte Zellen können auch in Kombination mit einem erfindungsgemäßen Vektor Patienten verabreicht werden. Diese Kombination beinhaltet, daß Zellen und Vektoren jeweils gleichzeitig oder zu unterschiedlichen Zeitpunkten, an gleichen oder an unterschiedlichen Orten verabreicht oder injiziert werden.

### III) Detailbeschreibung der Erfindung

#### 1) Methoden

a) Herstellung von niedrigmolekularem Polyethylenimin (LMW-PEI)  
LMW-PEI wird aus Aziridin durch eine ringöffnende Polymerisation in wäßriger Lösung unter Säurekatalyse gewonnen. Dazu wurde beispielsweise eine 10%ige Ethyleniminmonomer-Lösung in Wasser (5 ml Ethyleniminmonomer + 45 ml destilliertes Wasser, Auflösung unter Rühren) unter Zusatz von 1% (0,5 ml) konzentrierter Salzsäure (37°C) als Katalysator 4 Tage lang bei 50°C gerührt, einrotiert und unter Vakuum bei Raumtemperatur getrocknet. Die Molekulargewichtsbestimmungen wurden mittels Laserstreuungsmessung (Lichtstreuophotometer Wyatt Dawn DSP) bei 633 nm nach Direktinjektion in eine K5-Meßzelle durchgeführt. Die Molmassen werden aufgrund der in Toluol bestimmten Kalibrierkonstanten und der bekannten Probeinwaage bestimmt.

Die Molekulargewichtsbestimmung mit Hilfe der Lichtstreuanalyse ergab 2000 Da. Vergleichsweise hatte das kommerziell (Fa. Fluka, Neu Ulm) erhaltene PEI ein Molekulargewicht entsprechend der Lichtstreuanalyse von 791 kDa (HMW-PEI).

Beide Präparate (LMW-PEI und HMW-PEI) wurden vergleichsweise geprüft.

#### b) Präparation der Polynucleotidkomplexe

Die Komplexierung der Plasmid-DNA mit den PEIs erfolgt in Anlehnung an die Methode von Boussif et al. [Boussif et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 92: 7297-7301 (1995)]. 9 mg der 50%igen kommerziellen HMW-PEI-Lösung bzw. 9 mg LMW-PEI wurden in 9 ml bidestilliertem Wasser gelöst, mit 1 N HCl auf pH 7,4 eingestellt und mit Wasser auf ein Endvolumen von 10,0 ml aufgefüllt. Die fertigen Lösungen wurden sterilfiltriert (0,2 µm) und konnten bei 4°C längere Zeit gelagert werden.

Zur Komplexbildung wurden 10 µg Plasmid und die verschiedenen Mengen der PEI-Stammlösungen in jeweils 150 mM NaCl auf ein Endvolumen von 250 µl verdünnt und im Vortex gemischt. Einen Überblick über die Ansatz- und Äquivalentverhältnisse der Komplexe gibt die Tabelle 1. Nach 10minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Polymerlösungen portionsweise zu den Plasmidlösungen getropft und im Vortex gemischt. Bevor die Komplexe dem Zellkulturmedium zugesetzt wurden, wurden sie noch einmal 10 min lang inkubiert.

#### c) Agarose Shiftassay

Die Plasmid-Bindungs Kapazität der verschiedenen PEIs wurde in Agarosegel-Shiftassays kontrolliert. Dazu wurden 1,35-27 µg HMW-PEI und 2,7-90 µg LMW-PEI mit jeweils 10 µg Plasmid komplexiert (Tab. 1). 50 µl Aliquots wurden auf ein ca. 0,5 cm dickes Gel aus 1% (w/v) Agarose aufgetragen und in Tris-EDTA-Puffer pH 7,4 bei 80 mV 2 h lang entwickelt. Die Lokalisation der DNA wurde bei 254 nm nach Reaktion mit Ethidiumbromid visualisiert.

Zur Verdrängung der Plasmide aus den Komplexen wurden zu jeweils 10 µg-DNA-Komplex 50 bzw. 100 µl einer Dextransulfatlösung (Mw 5000, 10 mg/ml, Sigma, Deisenhofen) 30 min nach der Komplexbildung zugesetzt.

#### d) Zellkulturen

L929 Mausfibroblasten wurden unter den dem Fachmann geläufigen Standardbedingungen kultiviert. Diese Zellen wurden in einer Dichte von 8000 Zellen/Well in 96-Well-Zellkulturschalen ausgesät und 24h lang kultiviert, bevor sie für Toxizitätsexperimente verwendet wurden.

Die Kultivierung von 3T3 Fibroblasten erfolgte gleichermaßen unter Standardbedingungen.

ECV 304 (ATCC, Rockville, MD USA), eine spontan transformierte, adhärenthumane Endothelzelllinie, die aus einer scheinbar normalen Corda Umbilicalis etabliert wurde, wurde in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco, Eggenstein) mit 5% fötalem Kälberserum (FKS), 5% Pferdeserum und 1% N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamin (alle Gibco, Eggenstein) kultiviert.

Die bei 37°C, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> inkubierten Zellen wurden zweimal pro Woche nach Erreichen der Konfluenz mit Trypsin/EGTA-Lösung (2,5% Trypsin-Stocklösung, 50 mM Ethylenglycoltetraacettsäurelösung, PBS pH 7,4 im Verhältnis 1:1:8) passagiert. Da sich die Zellen nicht einzeln vom Untergrund ablösen, sondern Zellcluster bildeten, wurde jeweils eine 1/8 Passage durchgeführt.

Zerebrale kapilläre Endothelzellen wurden nach der Methode von Bowman et al. [19] und Mischek et al. [Mischek et al., Cell. Tiss. Res. 256: 221-226 (1989)] isoliert und kultiviert. Für Transfektionsversuche wurden sie unmittelbar nach der Isolierung in 6-Well-Zellkulturschalen ausgesät und bis zu ca. 50% Konfluenz kultiviert.

#### e) Zytotoxizitätsstudie

Die Toxizität der Polymere wurde mit dem MTT-Assay nach der Methode von Mosmann et al. [Mosmann, J. Immunol. Methods 65: 55-63 (1983)] an L929 Mausfibroblasten bestimmt. Die Verdünnungsreihen der Polymere wurden in DMEM mit 10% FKS und 2 mM Glutamin hergestellt und sterilfiltriert (0,2 µm, Schleicher & Schuell, Dassel). Falls erforderlich, wurden pH-Wert und Osmolarität der Lösungen korrigiert. Nach einer Vorinkubation von 24 h wurden die Zellen mit den Polymerlösungen versetzt und 1, 3, 12 und 24 h inkubiert. Die Viabilität der Zellen wurde UV-photometrisch durch Messung der Formazankonzentration quantifiziert.

In einer zweiten Serie von Experimenten wurden die Zellen generell nur 1 h lang mit den Polymeren behandelt, gewaschen und in PEI-freiem Zellkulturmedium bis zu 3, 12 und 24 h weiterkultiviert. Die Auswertung erfolgte wie oben beschrieben.

#### f) Transfektionen

Die in 3 cm<sup>3</sup>-Petrishalen ausgesäten 3T3 Mausfibroblasten und ECV 304 Zellen sowie die in 6-Well-Kulturschalen ausgesäten primären Endothelzellen, wurden unmittelbar vor den Experimenten mit PBS pH 7,4 gewaschen und mit neuem Medium supplementiert mit Serum versorgt. Die Komplexe des HMW-PEI und des LMW-PEI entsprechend 3,33 µg DNA pro Well oder Schale wurden zugesetzt und 1 h lang bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden 60 Stunden lang nachinkubiert und die Luciferase- bzw. β-Galactosidaseaktivität bestimmt analog Kapitel 9 und den Angaben des Herstellers.

#### 2) ERGEBNISSE

##### a) physikochemische Eigenschaften der PEIs

Das Verhalten der Polymere im Hinblick auf ihre Reaktion im endosomal-lysosomalen Kompartiment wurde durch Quellungsstudien bei verschiedenen pH-Werten im Bereich 4-10 in 0,1 M Phosphatpuffer bestimmt. Während sich HMW-PEI klar und ohne Rückstand bei pH 9 und 10 löste, war ab pH 8 eine intensive Trübung zu beobachten. Diese Trübung war bei pH 7 und 8 weitgehend stabil. Sedimentationsscheinungen traten erst nach mehreren Stunden auf. Bei pH-Werten im acidischen Bereich hingegen, kam es innerhalb von 30 min zur Bildung eines Sediments, das leicht resuspendiert werden konnte. LMW-PEI zeigte unter den gleichen Bedingungen keine Trübung oder Präzipitation, sondern ging klar in Lösung.

##### b) Zytotoxizitätsstudien

Die Toxizität der PEIs wurde *in vitro* an L929 Mausfibroblasten bestimmt, welche von verschiedenen Standardorganisationen als Standardzellkulturmodell zur Bestimmung der Zytotoxizität und Biokompatibilität von Polymeren empfohlen werden. In vorangegangenen Experimenten wurde eine direkte, lineare Proportionalität zwischen der gemessenen Absorption des gebildeten Formazans und der Zellzahl

im Bereich  $1 \times 10^3$  und  $3 \times 10^4$  Zellen festgestellt. 8000 Zellen/Well wurden nach einer 24 stündigen Wachstumsphase mit den Polymerlösungen versetzt und 1, 3, 12 und 24 h lang inkubiert. Die beobachteten toxischen Effekte des HMW-PEI und des LMW-PEI waren im Bereich von 0-1,0 mg/ml über einen Zeitraum von bis zu 24 h zeit- und konzentrationsabhängig, wobei die Zytotoxizitätsprofile für hoch- und niedermolekulares PEI deutliche Unterschiede zeigten. So lag die IC50 bei HMW-PEI zwischen 0,06 mg/ml (1 h Inkubation) und 0,04 mg/ml (24 h Inkubation) während bei LMW-PEI Konzentrationen zwischen 0,1 und 1,0 mg/ml erst nach 12 Stunden Inkubation toxisch wurden, eine IC50 erst nach 24 h Inkubationsdauer ermittelbar war und etwa bei 0,1 mg/ml lag.

#### c) Agarosegel-Shiftassay

Um das optimale Bindungs- und Mengenverhältnis zwischen Plasmid und PEI zu ermitteln, wurde eine konstante Menge Plasmid (10 µg) mit verschiedenen Konzentrationen HMW-PEI und LMW-PEI nach Vorschrift komplexiert und elektrophoretisch analysiert. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über das Ansatzverhältnis der untersuchten Komplexe, das Volumen an verwendeter Stammlösung und die absolute PEI-Menge.

a)

Ansatzverhältnis Plasmid/HMW-PEI [Äquivalente]	Volumen der Stammlösung [µl]	HMW-PEI absolute Menge [µg]
1+1	3	1,35
1+6,67	20	9
1+10	30	13,5
1+13,33	40	18
1+20	60	27

b)

Ansatzverhältnis Plasmid/LMW-PEI [Äquivalente]	Volumen der Stammlösung [µl]	LMW-PEI absolute Menge [µg]
1+2	3	2,7
1+13,33	20	18
1+20	30	27
1+26,67	40	36
1+40	60	54
1+53,33	80	72
1+66,66	100	90

**Tab.1:** Übersicht über die Ansatzverhältnisse der zur Elektrophorese und Transfektion verwendeten Komplexe mit a) HMW-PEI und b) LMW-PEI

Die Lokalisation der Plasmide und ihrer Komplexe wurde mittels Ethidiumbromid-Färbung sichtbar gemacht. Die DNA bildete zwei fluoreszierende Banden, die der supercoiled und der zirkulären Form des Plasmids entsprechen und die in Richtung Anode wanderten. HMW-PEI und LMW-PEI waren mit Ethidiumbromid nicht detektierbar.

Die Komplexierung von DNA mit HMW-PEI im Verhältnis 1+1 führte zu einer partiellen, noch unvollständigen Relardierung des Plasmids am Auftragsort. Die geringere Gesamtladung und/oder ein größerer Durchmesser hinderten den entstandenen Komplex an der Wanderung in der Gelmatrix.

Komplexe im Verhältnis 1+6 bis 1+20 waren nicht detektierbar, da sie keine Fluoreszenz zeigten, ein Hinweis auf den Ethidiumbromidausschluss der Plasmide bedingt durch eine effiziente Kondensation und physikalische Kompression ihrer Struktur durch das HMW-PEI. Die Anion/Kation-Verhältnisse liegen hier bei 1:1,2 (1+6) bis 1:4 (1+20). Die Komplexe sollten demzufolge eine positive Gesamtladung besitzen.

2,7 µg LMW-PEI konnten 10 µg Plasmid fast vollständig binden und retardieren. Der Komplex wies jedoch noch eine negative Gesamtladung auf und orientierte sich zur Anode. Die vollständige Kationisierung und Kondensation der DNA ließ sich jedoch erst ab 54 µg LMW-PEI beobachten.

Um den Effekt der Kondensation durch hoch- und niedermolekulares PEI zu verifizieren, wurde die DNA aus den fertigen Komplexen mit einem Überschuß an Dextrantransulfat verdrängt, das eine Konkurrenzreaktion mit den kationischen Polymeren eingeht. Sowohl im Falle des HMW-PEI als auch des LMW-PEI konnte die DNA aus den Komplexen wieder freigesetzt werden und ganz oder teilweise in die Gelmatrix wandern. Die Interkalation von Ethidiumbromid war wieder möglich und somit die DNA durch Fluoreszenz detektierbar.

#### d) In vitro Transfektionseffizienz

Die Transfektionseffizienz der PEI-Komplexe wurde sowohl mit Zelllinien (3T3 Maus-fibroblasten und humane endotheliale Zelllinie ECV304) als auch mit Primärkulturen (kapilläre Endothelzellen aus Schweinehirn) bestimmt. Als Reportergen wurde der kommerziell erhältliche pGL3-control Vektor der Fa. Promega verwendet, der ein Luciferasegen unter der Kontrolle eines SV 40-Promotors und -Enhancers trägt. Die Ansatzverhältnisse der Komplexe bezüglich Plasmid und Polymer entsprachen denen, die bei der Elektrophorese verwendet wurden.

Geprüft wurden Konzentrationen von 1,35 µg bis 27 µg HMW-PEI/10 µg DNA. Das Maximum der Transfektion zeigte sich bei 18 µg HMW-PEI. Eine weitere Erhöhung der Polymerkonzentration führte nur zu einer relativ geringfügigen Verminderung der Luciferase-Expression.

Beim LMW-PEI wurden Konzentrationen von 20-80 µg LMW-PEI /10 µg DNA geprüft. Im Gegensatz zu HMW-PEI konnte mit steigender Konzentration an LMW-PEI eine stetige Zunahme der Transfektionseffizienz in den ECV-Zellen detektiert werden. Bei 80 µg LMW-PEI/10 µg DNA wurde eine etwa 100fach höhere Reporter-genaktivität gemessen als bei Verwendung der maximal wirksamen Dosis von 18 µg HMW-PEI/10 µg DNA. Ein Rückgang der Luciferaseexpression wie beim hochmolekularen PEI war auch bei den höchsten Konzentrationen von LMW-PEI nicht zu beobachten. Die Versuche mit ECV-Zellen und den 3T3 Zellen lieferten identische Ergebnisse.

Zum Vergleich wurden die Transfektionsstudien mit  $\beta$ -Galaktosidase als Reportergen auch an endothelialen Primärzellkulturen mit den maximal tolerablen, nicht zytotoxischen Dosierungen (MTD) von HMW-PEI und LMW-PEI Komplexen durchgeführt. Die MTD in vitro lag bei 13,5 µg HMW-PEI/10 µg DNA und bei 90 µg LMW-PEI/10 µg DNA. Kultivierte kapilläre Endothelzellen aus Schweinehirnen, die mit Komplexen aus 10 µg DNA und 13,5 µg HMW-PEI inkubiert wurden, ließen sich kaum transfizieren. Nur 2-3 Zellen pro Kulturapf (Well) zeigten die charakteristische Blaufärbung im Bereich der Zellkerne. Die Erfolgsrate der Transfektion lag unter 1% der behandelten Zellen. Die Inkubation mit Komplexen aus 90 µg LMW-PEI und 10 µg DNA hingegen führte zu einer deutlichen Expression des Markerproteins in den Endothelzellen. Der prozentuale Anteil an blau gefärbten Zellen pro Kulturapf in Relation zur Gesamtzellzahl, d.h. die Erfolgsrate der Transfektion lag zwischen 5% und 10%. In keinem Fall konnten toxische Effekte der Polymer/DNA-Komplexe an den Zellen lichtmikroskopisch beobachtet werden.



### Patentansprüche

- 1) Vektoren enthaltend Komplexe aus Polyethylenimin mit einem Molekulargewicht unter 50.000 Da, mit nicht viralen oder viralen Nukleinsäurekonstrukten zur Einführung dieser Nukleinsäurekonstrukte in eine Zelle.
- 2) Polyethylenimine nach Anspruch 1) mit einem Molekulargewicht zwischen 500 Da und 30.000 Da.
- 3) Polyethylenimine nach Anspruch 1) und 2) mit einem Molekulargewicht zwischen 1000 Da und 5000 Da.
- 4) Methode zur Herstellung von Polyethyleniminem gemäß Anspruch 1-3) dadurch charakterisiert, daß monomeres Ethylenimin in wässriger Lösung durch Zugabe von Salzsäure polymerisiert wird.
- 5) Vektoren nach Anspruch 1-3), bei welchem das Polyethylenimin an einen zielzell-spezifische Liganden gekoppelt ist.
- 6) Verwendung von Vektoren gemäß Anspruch 1-5) für die Einführung von nicht viralen oder viralen Nukleinsäurekonstrukten in eine Zelle und die Verabreichung dieser Zelle an einen Patienten zum Zwecke der Prophylaxe oder Therapie einer Erkrankung.
- 7) Zellen gemäß Anspruch 6), wobei die Zelle eine Endothelzelle, ein Lymphozyt, ein Makrophage, eine Leberzelle, ein Fibroblast, eine Muskelzelle oder eine Epithelzelle ist und diese Zelle lokal auf die Haut, subkutan, intramuskulär, in eine Wunde, in eine Körperhöhle, in ein Organ oder in ein Blutgefäß injiziert wird.
- 8) Verwendung von Vektoren gemäß Anspruch 1-5) zur Prophylaxe oder Therapie einer Erkrankung, wobei die Vektoren lokal auf die Haut, subkutan, intramuskulär, in eine Wunde, in eine Körperhöhle, in ein Organ oder in ein Blutgefäß injiziert werden.